

日 本 国 特 許  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年11月25日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-341415

[ ST.10/C ]:

[ JP 2002-341415 ]

出 願 人

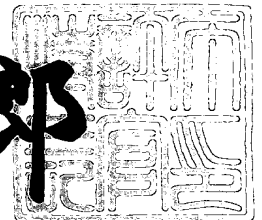
Applicant(s):

扶桑薬品工業株式会社  
大野 典也

2003年 6月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3041311

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1112

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都港区西新橋 3 - 2 5 - 8 東京慈恵会医科大学内

    【氏名】 武山 浩

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区深沢 2 - 5 - 1 5

    【氏名】 大野 典也

【特許出願人】

    【識別番号】 000238201

    【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【特許出願人】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区深沢 2 - 5 - 1 5

    【氏名又は名称】 大野 典也

【代理人】

    【識別番号】 100088904

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 庄司 隆

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 067070

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗腫瘍剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ベンジルアルコールを主成分とする抗腫瘍剤。

【請求項 2】 腫瘍細胞にネクロシスを起こすために必要十分な量のベンジルアルコールを投与することを特徴とする請求項 1 の抗腫瘍剤。

【請求項 3】 ベンジルアルコールの投与量が、腫瘍細胞の正常細胞からの剥離をマーカーにして特定され、剥離に必要十分な量である請求項 2 に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 4】 ベンジルアルコールの投与量が、 $1\text{ mg} \sim 50\text{ mg}$  /腫瘍体積当り ( $\text{cm}^3$ ) であることを特徴とする請求項 2 又は 3 に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 5】 ベンジルアルコールの投与量が、 $0.1 \sim 5\%$  の水溶液として投与することを特徴とする請求項 4 に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 6】 外用剤である請求項 4 又は 5 の抗腫瘍剤。

【請求項 7】 経口投与又は非経口投与される請求項 4 又は 5 の抗腫瘍剤。

【請求項 8】 腫瘍が、乳癌、大腸癌、甲状腺癌、結腸癌、盲腸癌、子宮頸癌、悪性黒色腫、膵臓癌又は胃癌である請求項 1 ～ 7 の何れか一に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 9】 ヘパリン及び/又はビタミン C と併用される請求項 1 ～ 8 の何れか一に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 10】 請求項 1 ～ 9 の何れか一に記載の抗腫瘍剤による腫瘍の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な抗腫瘍剤又は治療方法に関する。さらに詳しくは、ベンジルアルコールの新規な用途に関する。

【0002】

## 【従来の技術】

ベンジルアルコール（以下において、BAと略することがある。）は日本国局法品であり、毒性の少ない局所麻酔剤で、低濃度の水溶液は局所麻酔作用、高濃度で局所刺激作用を有している。また、殺菌作用を持ち、石炭酸係数は、チフス菌0.4、大腸菌0.6、黄色ブドウ球菌0.5などと報告されており。生体内では、安息香酸となり、馬尿酸として排泄される。適用としては、局所麻酔作用と消毒作用に基づいて、10%の軟膏又はエタノール、水、ベンジルアルコールが等量のローションが止痒の目的で用いられている。歯痛の鎮痛の目的には、歯神経、う歯腔に点滴する。また、注射液を皮下又は筋注したときに起こる疼痛を緩和する目的で1～4%の割合で注射液に加えられている。現在ではBAは局所麻酔剤として単独で使用されることは余りなく皮下、筋肉注射用薬剤の添加溶剤として使用され、通常投与量として0.9%水溶液(W/V/%、溶媒：生理的食塩水)の形状で200-300 m g / d a y が使用可能とされている。

また、ベンジルアルコールは食品薬理学的には食物の混合摂取（例えば魚、肉のこげた部分とある種の野菜の食べ合わせ）により体内で生成されるニトロソアミンなどの発癌物質が生成する細胞障害性活性酸素を除去する働きを持ついわゆる Free radical scavenger であることが知られており発癌抑制機能を持つとされている。しかしながら癌に対しての直接的な抗腫瘍効果を持っているとの報告は発明者等の検討した限り認められない。

## 【0 0 0 3】

## 【解決すべき課題】

本発明は、安全性が十分に確保されたベンジルアルコールの抗腫瘍剤としての新規用途を確立することである。

## 【0 0 0 4】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者は、数年前より、ベンジルアルコールの腫瘍細胞への作用に着目し、その使用方法、処置方法について種々検討してきた。その結果、BAの癌細胞部位

への局所投与は、極めて効率的に癌細胞の剥離を促進することを見出し、その抗腫瘍剤としての意義を確認し、さらに抗酸化剤との併用で一層の効果の増大を確認し本発明を完成した。

つまり本発明は、

「1、ベンジルアルコールを主成分とする抗腫瘍剤。

2、腫瘍細胞にネクローシスを起こすために必要十分な量のベンジルアルコールを投与することを特徴とする請求項1の抗腫瘍剤。

3、ベンジルアルコールの投与量が、腫瘍細胞の正常細胞からの剥離をマーカ―にして特定され剥離に必要な十分な量である請求項2に記載の抗腫瘍剤。

4、ベンジルアルコールの投与量が、1 m g ～ 5 0 m g /腫瘍体積当り ( c m <sup>3</sup> ) であることを特徴とする請求項2又は3に記載の抗腫瘍剤。

5、ベンジルアルコールの投与量が、0. 1 ～ 5 % の水溶液として投与することを特徴とする請求項4に記載の抗腫瘍剤。

6、外用剤である請求項4又は5の抗腫瘍剤。

7、経口投与又は非経口投与される請求項4又は5の抗腫瘍剤。

8、腫瘍が、乳癌、大腸癌、甲状腺癌、結腸癌、盲腸癌、子宮頸癌、悪性黒色腫、脾臓癌又は胃癌である請求項1～7の何れか―に記載の抗腫瘍剤。

9、ヘパリン及び/又はビタミンCと併用される請求項1～8の何れか―に記載の抗腫瘍剤。

10、請求項1～9の何れかに記載の抗腫瘍剤による腫瘍の治療方法。」からなる。

## 【0005】

### 【発明の実施の態様】

本発明の主成分はベンジルアルコールである。その性状、確認方法、製法、薬効薬理、適用は、局法に詳しいので省略する。また、その製剤化も局法に詳しい。抗腫瘍とは、広く癌細胞を意図するが、細胞表皮癌が特に好適であり、胃癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、盲腸癌、大腸癌、子宮頸癌、甲状腺癌、脾臓癌、悪性黒色腫等が好結果を得ている。

## 【0006】

製剤は、局所投与剤或は全身投与剤のいずれでもよく、特に限定はされないが、好適には局所投与である。投与形態は、経口、外用、筋肉等の非経口等特に限定されず適用可能であるが、癌の種類、癌の部位に応じて選択可能である。

## 【0007】

本発明のBAは、無論単独でも十分な抗腫瘍効果を発揮しうるが、より好適には抗酸化剤との併用は、癌細胞の浸潤・剥離に好結果をもたらす。併用には、ビタミンA、ビタミンC、ヘパリン等が例示される。その添加量は、BAの1重量部に対して、0.1～10倍重量部等が例示される。

## 【0008】

製剤は、例えば注射液を想定する場合、BZの1～5重量% (w/v) に調製される。本発明からなる抗腫瘍剤の投与量は、投与方法によってことなり一般的な定義は困難であるが、その効果のマーカーとして、腫瘍細胞をネクローシスを起こす又は腫瘍細胞の正常細胞からの剥離をマーカーにして特定され、そのネクローシスもしくは剥離を必要十分な量が投与されうる。ベンジルアルコール投与量は、1～50、好ましくは1.5～30、より好ましくは2.3～18.86 mg/腫瘍体積 (cm<sup>3</sup>) で処理される。ベンジルアルコールの投与は、0.1～5%、好ましくは0.76～4% (w/v) の水溶液に調製されるのを用いることが好適である。投与回数は、1日1～数回、毎日又は隔日、10日～数ヶ月で、剥離効果は達成される。

## 【0009】

また、人体において腫瘍に無水エタノール (100%) を局所投与し、腫瘍細胞を破壊する治療法が現在PEIT療法 (Percutaneous Ethanol Injection) として肝癌などが施行されている。この際、腫瘍体積をCT, 超音波検査で計測し、「縦×横×高さ」の値に $\pi/6$ を乗じたもの「 $\pi/6 \times \text{縦} \times \text{横} \times \text{高さ}$ 」が投与量として一般的に使用されている。本研究に係るBAの腫瘍の局所投与における投与量の算出にも利用できる。

## 【0010】

以下の実施例で述べるcolorimetric assayは、細胞の接着能の検定に用いるこ

とができ、Thymidine incorporate assayは細胞の生死を検定することに用いることができる。上記2つの検定方法は、腫瘍細胞の挙動を測定するための一般的な方法である。Colometric Assayは、Enhancer sequences of DF3 gene regulate expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and confer sensitivity of human breast cancer cell to ganciclovir: Manome Y, Abe M, Hagen F. M, Fine A. H, and Kufe W. D. Cancer Research 54: 5408-5413. 1994、また、Thymidine Incorporate Assayは免疫実験操作法II（右田俊介、紺田 進、本庶 佑、濱岡俊之 編 773-774、南江堂、1995）を参照できる。

#### 【0011】

以下の実施例で述べるDNA Laddering法、TUNEL法、Caspase 法ともに細胞死がアポトーシスによるものであるかを検定する一般的な方法である。DNA Laddering法は新アポトーシス実験法（辻本加英、刃称重信、山田 武 編、59-66羊土社、1999）、TUNEL法の引用文献は新アポトーシス実験法（辻本加英、刃称重信、山田 武 編、67-74羊土社、1999）、Caspase 法の引用文献は新アポトーシス実験法（辻本加英、刃称重信、山田 武 編、198-200羊土社、1999）を参照できる。

#### 【0012】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

#### 【0013】

##### 【実施例1】 in vitroにおけるBAの胃癌細胞に対する抗腫瘍効果

1) 胃癌細胞株 (STKM)  $1 \times 10^6$  個に BAをそれぞれ1, 1.5, 2.0, 2.5, 5mg/mlのように比例した濃度で、またcontrolとして同量の生理的食塩水を添加した後、37℃にて48時間培養し細胞の形態を倒立顕微鏡で観察後、細胞の接着能、生死をcolorimetric assay、thymidine incorporate assayにより測定した。



【0014】

①colorimetric Assayによる細胞接着能の検定

100%glutalaldehydeをmediumの1/4量 ( $250\mu\text{l}$ ) 添加し、室温で15分静置した。次に洗浄した後に、0.05%Methylene Blue in PBSを $250\mu\text{l}$  添加し、室温で15分静置した。次に、洗浄した後に、0.33N HClを $250\mu\text{l}$  添加し、室温で15分静置した後に、OD (600 nm) にて測定した。

【0015】

細胞の接着能はBAを濃度比例的に添加したところ、1.5 mg/mlの濃度付近から接着能が比例的に減少した (図1)。

【0016】

②Thymidine incorporate assayによる細胞死の検定

thymidine-methyl- $^3\text{H}$  ( $0.37\text{kBq}/10\mu\text{l}$ , ICN, Biochemicals, Inc. Irvine CA) を $1\times 10^6$ 個の細胞に添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、6時間培養した。次に50%-TCAにて反応停止を行い、GF/Cglass filter (10mm diameter) (Whatman, Maidstone, England) にて濾過した。filterと沈殿物を5回、5%TCAにて洗浄した。filter、沈殿物に7mlのscintigram cocktail (Optiphase HiSafe 2, Wallac Scintillation products, Turku, Finland) を添加し、放射線量を1分間 Beckman LSLiquid scintillation counter (Beckman, Alvertville, MN) にて測定した。

【0017】

細胞死は1mg/mlの濃度付近より増加し始め、接着能と同様にBAの濃度と比例して増加した (図2)。

【0018】

図3は、 $1\times 10^6$ 個の細胞にBAを2.5mg/mlの濃度で1ml 添加した後 $37^\circ\text{C}$ 、48時間培養した後の像である。Controlとしては同量の生理食塩水を添加し同様に培養した。BAにおいては細胞の形状が変化し紡錘状から円形となり、膨化しているのが認められる。また核も黒色化し目だっている。以上の結果により、in vitroにおける胃癌細胞において、細胞死が起こったことを確認できた。

【0019】

実施例1の結果により、in vitroにおけるBAの胃癌細胞に対する抗腫瘍効果が

証明でき、その細胞死は1.5 mg/mlの濃度付近より増加し、濃度依存的であった。

#### 【0020】

##### 【実施例2】in vivoにおけるBAの胃癌細胞に対する抗腫瘍効果

ヌードマウスの背部に胃癌細胞株（STKM） $1 \times 10^8$ 個を皮下注射し、8週間後腫瘍が直径5mm以上まで形成された時点で腫瘍あるいは腫瘍周囲に腹BAを4mg/0.5ml週2回、4週間投与した。controlとして0.5mlの生食水を腫瘍に局所注射した。腫瘍径を測定、腫瘍を採取し組織にH-E染色し、顕微鏡観察を行った。

#### 【0021】

胃癌細胞（STKM）を生体に移植し腫瘍径が5mm以上になったところでBAを4mg/0.5ml週2回、4週間投与したところ、16mg（2週間）投与したところで腫瘍径はcontrolに比較して明らかに縮小し、32mg（4週間）投与にて腫瘍径は1/2以下となった。

#### 【0022】

図8、9は4週間後腫瘍を摘出した後、10%ホルマリンにて固定、3μmの切片を作製し、H-E染色を施行したものである。図8はcontrolとして生理食塩水を添加したものである。腫瘍細胞は皮膚近くまで互いに接着し密に増殖しており、細胞質、核もしっかりしている。図9はBAを投与したものであるが、細胞は粗となり、細胞質の膨化、封入体状のものの出現、核の縮小が認められている。以上の結果により、in vivoにおける胃癌細胞において、細胞死が起こったことを確認できた。

#### 【0023】

実施例2の結果により、in vivoにおけるBAの胃癌細胞に対する抗腫瘍効果が証明できた。

#### 【0024】

##### 【実施例3】

BAによる細胞死の効果

細胞死を誘導し得た細胞群に対し、その細胞死がアポトーシスなのかネクローシスなのかを検討するため、細胞死を誘導する一定濃度以上のBAを細胞に添加し、細胞の形態変化を認めた後、細胞を回収し、DNA断片化を評価するためのゲル電気泳動によるDNA Laddering法、細胞染色によるTUNEL法を行った。

【 0 0 2 5 】

DNA Laddering法

1.5×10<sup>6</sup>個の細胞（STKM）に2.5mg/mlのBAを2ml添加し37℃で48時間培養後、細胞を回収した。回収した細胞を遠心後、100μlのlysis buffer（10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, PH8.0, 0.5% SDS, 0.5mg/ml proteinase K）を添加し、50℃で3時間培養した。次に、100μlのloading buffer（10mM EDTA, 1% w/v low melting agarose, 0.25% bromo phenol blue, 40% sucrose）を添加し、2% agarose gel in TAE bufferでsampleを電気泳動（37V, over night）した。

【 0 0 2 6 】

BAを2.5mg/mlの濃度で2ml添加したSTKM（胃癌細胞株）においてもladderingは認められなかった（図6）。

【 0 0 2 7 】

TUNEL法

1.5×10<sup>5</sup>個の細胞をスライドグラス上で、2.5mg/mlのBAを2ml添加し 37℃48時間培養後、1%paraformaldehyde in PBSにて室温、10分固定した。Controlとしては同量の生理的食塩水を添加したものを使用した。その後これら切片にApop tag In Situ Apoptosis Detection kits(Intergen, NY, US)を使用した。概略は次の様である。

- 1.切片に3%hydrogen peroxide in PBSを5分室温にて添加
- 2.Working strength TdT enzymeを37℃にて1時間反応
- 3.anti-Digoxigenin conjugate を室温、30分反応
- 4.Working strength peroxidase substrate と反応（室温、3—6分）
- 5.counter stainingとして0.5%methyl green と反応（室温、10分）

【 0 0 2 8 】

2.5mg/mlのBAを2ml添加した細胞株では、核にDigoxigenin の染色像は認め

られなかった（図7）。

【 0 0 2 9 】

Caspase-3、Caspase-8 活性測定法

1.5×10<sup>6</sup>個の細胞に2.5mg/mlのBAを2m l 、 negative control として同量の生理食塩水、 positive controlとしてAraC 1×10<sup>-5</sup>M(キロサイト、日本新薬)を添加後、37℃48時間培養後細胞を回収した。その後CPP32/Caspase-3, -8 Colorimetric Protease Assay Kit (MBL社)

を使用し施行した。概略は次の様である。

- 1.回収した細胞に0.5m l のcell lysis buffer を添加、室温10分反応
- 2.sonication(30secx2, Branson, SONIFIER 250)
- 3.遠心分離(10,000rpm, 3min, HITACHI, himac CF15D)
- 4.supernatant回収
- 5.supernatantの50 μ l にreaction bufferを50 μ l , 活性測定用基質 (IETD-pNA)を 5 μ l 添加し37℃、1時間反応
- 6.蛍光強度測定（励起波長400nm, 蛍光波長505nm）

【 0 0 3 0 】

Caspase-3活性測定においてはBA添加細胞は45.4 (RFI/well/Hr) とpositive controlより有意に低かった (P<0.001) 。またCaspase-8活性においてもBA添加細胞は同様にpositive controlより有意に低くnegative controlとほぼ同等の値であった（図8、9）。

【 0 0 3 1 】

実施例3の結果により、BA投与による細胞死の効果は、ネクローシスであることが証明された。

【 0 0 3 2 】

【実施例4】

BA投与による正常細胞の効果

BA投与による細胞死を引き起こすのが、腫瘍細胞に特異的であることを確認するために、正常細胞株である臍帯細胞株（Huvec）、肺細胞株（WI38）においてc

olorimetric Assayを実施例 1 と同様な方法で行った。コントロールとして、胃癌細胞株 (STKM) を用いた。

【 0 0 3 3 】

BAを投与により、Huvec、WI38とも癌細胞株と同様細胞死が濃度依存的に生じたがSTKMと比較するとその効果は低いと考えられた。また、Huvec、WI38と最初の細胞数がSTKMより約1/10となっていることを考慮にいれても、HuvecとWI38を比較するとWI38の方がBAに対して抵抗性があった (図10)。

【 0 0 3 4 】

実施例 4 の結果により、BA投与による細胞死の効果は正常細胞と比べて腫瘍細胞により強く効果を与えることが証明された。

【 0 0 3 5 】

【実施例 5】

乳癌細胞株 (MCF-7、BSMZ)、大腸癌細胞株 (DLD、LOVO)、甲状腺癌細胞株 (SW1736)、脾臓癌 (PA-1) について実施例 1、2、3 と同様の方法により検討をおこなった。その結果、各細胞死は1.5mg/mlの濃度付近より増加し始め、接着能と同様にBAの濃度と比例して増加した。また、その細胞死は、アポトーシスではなくネクローシスであることを確認した。

【 0 0 3 6 】

本発明の安全が確保されたベンジルアルコールの投与は、抗腫瘍効果が達成できた。よって、本発明のベンジルアルコールは腫瘍の治療の有効な手段となりえる。

【 0 0 3 7 】

【発明の効果】

本発明は、安全性が十分に確保されたベンジルアルコールの抗腫瘍剤としての新規用途に成功した。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 STKM細胞のcolorimetric Assayによる結果である。

【図 2】 STKM細胞のThymidine incorporate assayによる結果である。

【図 3】 in vitroによるSTKM細胞の倒立顕微鏡写真。左図は、生理食塩水を添加。右図は、BAを添加。

【図 4】 in vivoによるH-E染色STKM細胞の倒立顕微鏡写真。生理食塩水を添加。

【図 5】 in vivoによるH-E染色STKM細胞の倒立顕微鏡写真。BAを添加。

【図 6】 in vitroによるDNA Ladderingのゲル電気泳動の結果である。

【図 7】 TUNEL法によるSTKM細胞の倒立顕微鏡写真

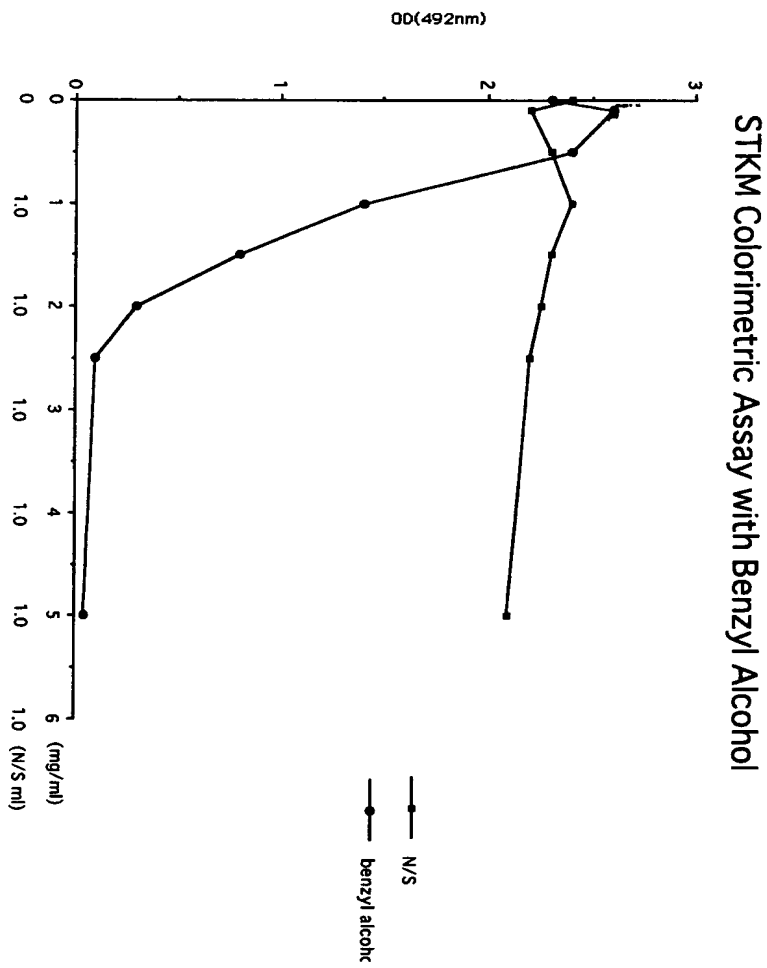
【図 8】 Caspase-3の活性測定結果である。

【図 9】 Caspase-8の活性測定結果である。

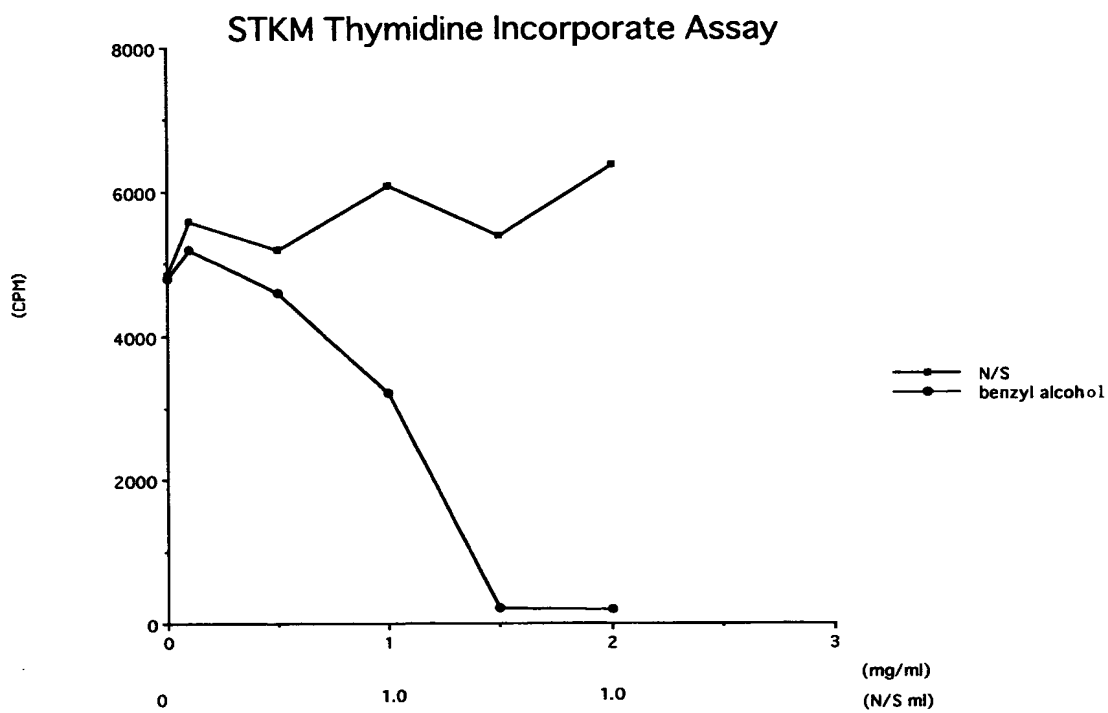
【図 10】 正常細胞（Huvec、WI38）のcolorimetric Assayによる結果である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】





【図 3】

STKM with Benzyl Alcohol

Control(N/S)

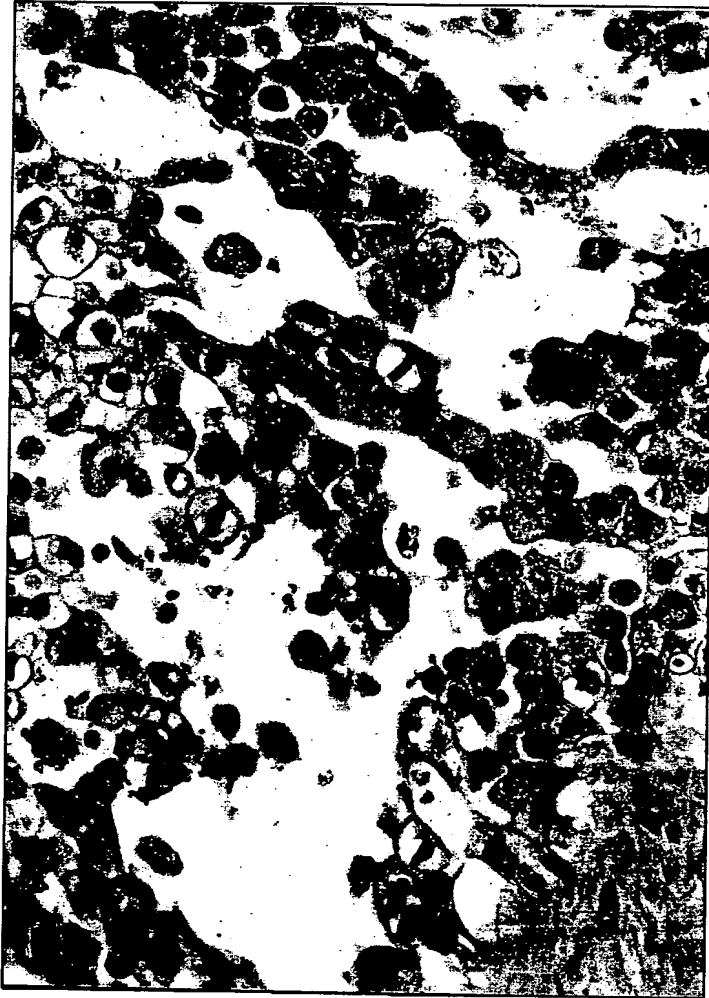
Benzyl Alcohol (2.5mg)



【図4】

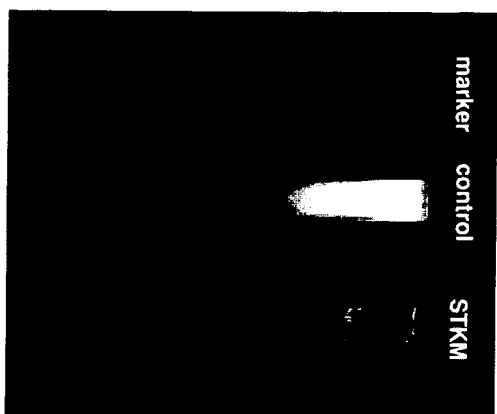


【図5】



【図 6】

**DNA laddering of STKM in vitro**

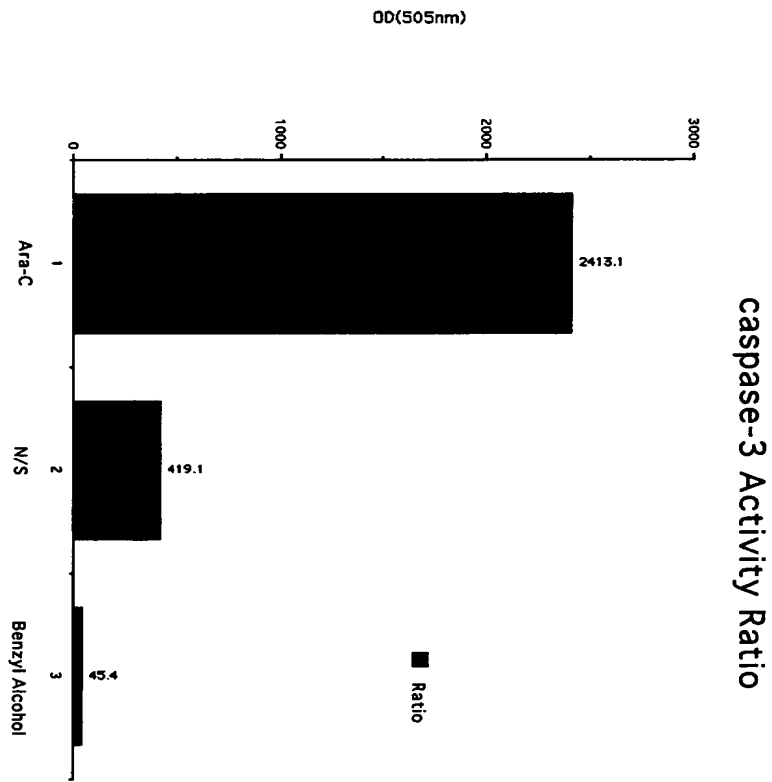


【図7】

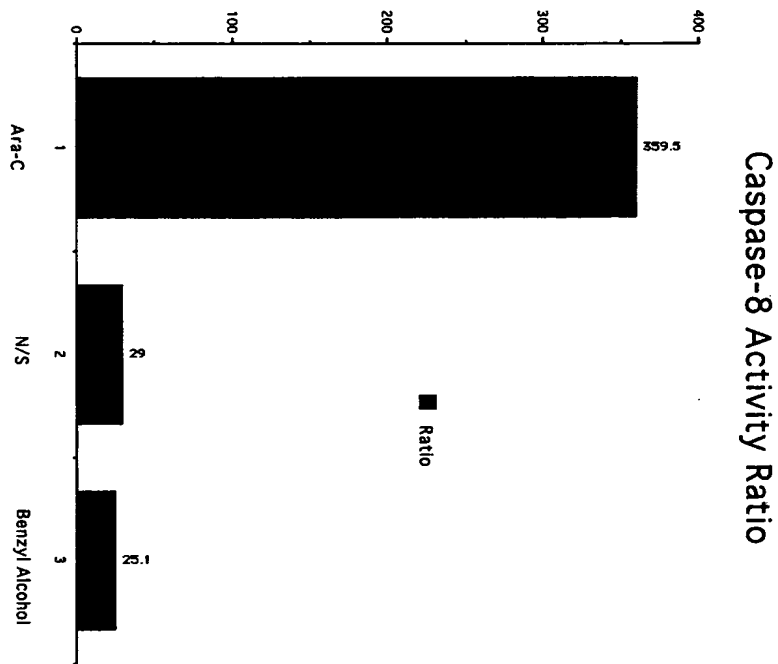


Benzylalcohol(2.5mg/ml) TUNEL Methods

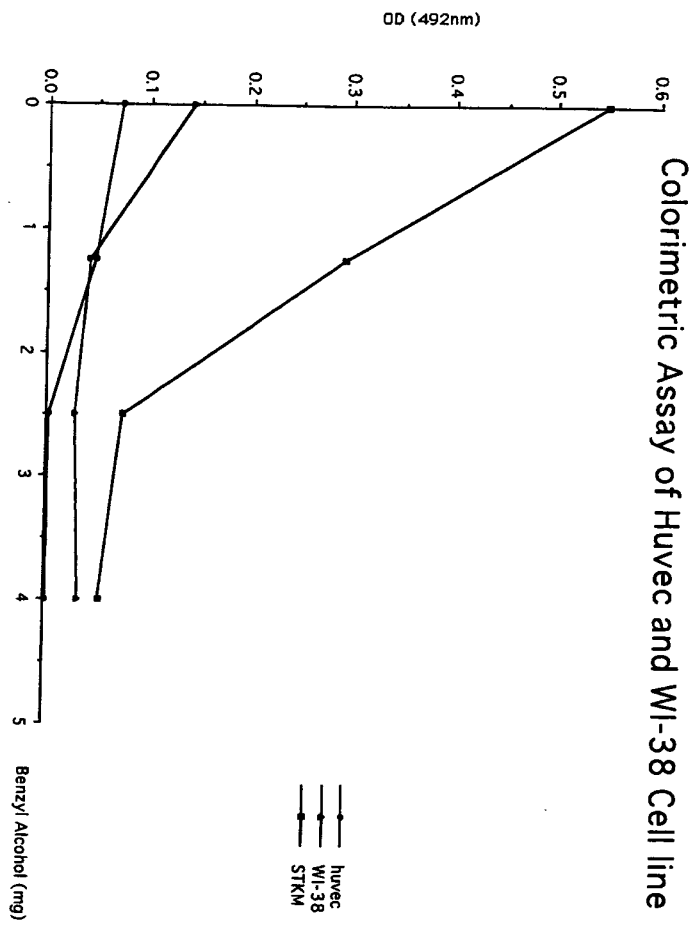
【図 8】



【図 9】



【図 10】





【書類名】要約書

【要約】

【課題】本発明は、安全性が十分に確保されたベンジルアルコールの抗腫瘍剤としての新規用途を提供すること。

【解決手段】本発明者は、ベンジルアルコールの腫瘍細胞への作用に着目し、その使用方法、処置方法について種々検討し、ベンジルアルコールの癌細胞部位への局所投与は、極めて効率的かつ癌細胞特異的に剥離を促進することを見出し、その抗腫瘍剤としての意義を確認し、さらに抗酸化剤との併用で一層の効果の増大を確認した。

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-341415
受付番号	50201778708
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 1月31日

### <認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年11月25日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000238201]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号  
氏 名 扶桑薬品工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [500454574]

1. 変更年月日 2000年 9月29日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都世田谷区深沢2-5-15  
氏 名 大野 典也